

LEUKOZYTENSTIMULATIONS-MATRIX

5

Gebiet der Erfindung

10 Die vorliegende Erfindung betrifft eine Leukozytenstimulations-Matrix, ein Leukozytenstimulations-Modul, welches die Leukozytenstimulations-Matrix umfasst, sowie ein Verfahren zur Leukozytenstimulation und/oder zur Induktion einer immunologischen Toleranz.

15

Hintergrund der Erfindung

Die antigenspezifische Stimulation von Leukozyten ist ein wichtiges und wachsendes Forschungsgebiet zur Modulation von 20 Immunreaktionen (Impfung, adoptive Immuntherapie u.s.w.). Derzeit sind in diesem Zusammenhang neben der Impfung im herkömmlichen Sinn vorwiegend therapeutische Ansätze zur ex vivo-Stimulation von Blutzellen bekannt.

25 Es existiert derzeit keine ausreichend funktionierende Therapie bei einer Vielzahl viralen chronischer Infektionserkrankungen. Die Chronizität basiert auf der Persistenz des viralen Antigens im Gewebe und der unzureichenden Immunantwort dagegen. Virale Erkrankungen werden zumeist mit Chemo-30 therapeutika therapiert. Dies hat häufig eine Resistenzbildung der Viren und starke Nebenwirkungen zur Folge. Bisherige Experimente mit der ex vivo Stimulation von dendritischen Zellen und Effektorzellen mittels dendritischer Zellen (DC) z.B. bei Tumorerkrankungen waren nur bedingt 35 erfolgreich (Cerundolo et al., Nature Immunology, Bd. 5, Nr. 1, S. 7-10, 2004). Vermutlich ist die ex vivo-Stimulation der

Effektorzellen und die anschließende Rückfuhr in den Patienten zu störanfällig und zu schwach, um klinisch relevante Veränderungen zu induzieren. Darüber hinaus werden bei den derzeitig angewandten Methoden die dendritischen 5 Zellen und Effektorzellen isoliert, die in sehr geringer Menge im Blut vorkommen. Die ex vivo Expansion dieser Zellen ist dabei ein weiterer störanfälliger Schritt.

Die antigenspezifische Stimulation der Leukozyten in Vollblut 10 (in vivo) hat im Gegensatz zur ex vivo-Stimulation den Vorteil, dass alle physiologischen und essentiellen Faktoren des Bluts, die zur antigenspezifischen Leukozytenaktivierung notwendig sind, ausgenutzt werden können.

15 Die WO 00/27999 offenbart die Einbettung von hämatopoietischen Vorläuferzellen, Antigen-präsentierenden Zellen und lymphoretikulären Stromalzellen in eine poröse, feste Matrix, wobei die Matrix mit biologischen Mitteln beschichtet und mit einem gelartigen Mittel imprägniert sein kann. Diese Matrix 20 kann zur Induzierung einer T-Zellreaktivität in vitro verwendet werden.

Die WO 93/20185 offenbart ein in vitro-Verfahren zur Proliferation von Vorläufern dendritischer Zellen.

25 WO 97/03186 (US 6,121,044) offenbart ein implantierbares Modul, welches eine Matrix mit eingebetteten dendritischen Zellen (DC) aufweist, mit dem eine primäre und sekundäre Immunantwort verursacht werden kann. Diese Veröffentlichung 30 betrifft zwar auch ein in vivo verwendbares Modul, das Modul weist jedoch den Nachteil auf, dass eine Immunantwort mittels des dort offenbarten Moduls bzw. der Matrix nicht zeitlich gesteuert werden kann. Bei dieser Art der Stimulation ist es nicht gewährleistet, dass Leukozyten nach einer erfolgten 35 Aktivierung kontrolliert von der stimulierenden Matrix

abgelöst werden können, um zurück in den Blutstrom zu gelangen.

5 Banchereau und Steinmann beschreiben in Nature, Bd. 392, S.245-252, 1998 in einem Übersichtsartikel dendritische Zellen und deren Beteiligung an der Steuerung der Immunantwort.

10 Die WO 03/030965 offenbart ein Modul zur Leukozytenstimulation, wobei in dem Modul auf einem Träger ein Komplex aus Antigen-präsentierender Zelle (MHC) und Antigen immobilisiert ist. Dieses Dokument offenbart auch, dass eine Ablösung stimulierter Leukozyten erfolgt, es ist jedoch nicht offenbart, wie eine solche Ablösung kontrolliert gesteuert
15 werden kann.

20 WO 03/031473 offenbart ein Modul zum Herabsetzen der Aktivität von Leukozyten, welches einen Träger und einen Liganden umfasst, der an den Träger gebunden ist und zur Wechselwirkung mit einem Rezeptor von Leukozyten geeignet ist.

25 Ziel der vorliegenden Erfindung ist es, eine Matrix oder eine die Matrix umfassende Vorrichtung bereitzustellen, mit der es möglich ist, in vivo Leukozyten zu stimulieren und/oder eine immunologische Toleranz im Blutkreislauf zu induzieren, wobei die stimulierten Leukozyten zeitlich kontrolliert wieder von der Matrix ablösbar sind.

30

Gegenstand der Erfindung

Das oben erwähnte Problem der Erfindung wird durch eine Leukozytenstimulations-Matrix nach Anspruch 1 und ein
35 Leukozytenstimulations-Modul gemäß Anspruch 12 gelöst.

Die Leukozytenstimulations-Matrix der vorliegenden Erfindung weist folgende Bestandteile auf:

- a) ein oder mehrere Träger,
- b) eine lösliche Matrix zur Einbettung eines oder mehrerer Bestandteile zur Generierung einer Leukozytenstimulation und/oder Induktion einer immunologischen Toleranz,
- c) ein oder mehrere in die lösliche Matrix eingebettete Bestandteile zur Generierung einer Leukozytenstimulation und/oder Induktion einer immunologischen Toleranz.

Gemäß der vorliegenden Erfindung binden zirkulierende Antigen-spezifische Leukozyten an die in die lösliche Matrix eingebetteten Bestandteile, werden dort zeitweise gebunden, stimuliert und verlassen als aktive Zellen die Matrix bzw. ein Modul, welches die Leukozytenstimulations-Matrix enthält.

Durch eine derartige erfindungsgemäße Leukozytenstimulations-Matrix kann eine sukzessive kontrollierte Auflösung der äußeren Matrixoberfläche innerhalb eines vorbestimmten Zeitrahmens, bevorzugt innerhalb von Stunden bis zu etwa einem Tag, gewährleistet werden. Die lösliche Matrix löst sich kontrolliert schichtweise in einer Leukozyten enthaltenden Flüssigkeit, bevorzugt Vollblut, ab, wobei auch in der löslichen Matrix enthaltene Bestandteile zur Generierung einer Leukozytenstimulation und/oder Induktion einer immunologischen Toleranz (z.B. Antigene) abgelöst werden können, und hieran gebundene Leukozyten von der Matrix entfernt werden. Bei Einbringen der Leukozytenstimulations-Matrix bzw. eines Moduls, welches diese enthält, in den Körper werden diese Leukozyten durch die Blutzirkulation zurück in den Körper überführt. Die Auflösungszeit der jeweils äußeren Schichten der löslichen Matrix wird so gewählt, dass eine für die jeweilige antigenspezifische

Leukozytenaktivierung geeignete Bindungsintensität und Bindungsdauer gewährleistet wird.

In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung sind zusätzlich zu den Bestandteilen a) bis c) ein oder mehrere Bindungskoppler vorgesehen, um eine Bindung zwischen Träger und den ein oder mehreren Bestandteilen zur Generierung einer Leukozytenstimulation und/oder Induktion einer immunologischen Toleranz zu vermitteln. Bevorzugt handelt es sich bei der vermittelten Bindung um eine kovalente Bindung, so dass zumindest ein Teil der eingebetteten Bestandteile zur Generierung einer Leukozytenstimulation und/oder Induktion einer immunologischen Toleranz über die Bindungskoppler kovalent mit dem Träger verbunden ist. Erfindungsgemäß sind aber auch nicht-kovalente Bindungen, also z.B. ionische Bindungen, Bindungen aufgrund hydrophober Wechselwirkungen, van der Waals-Wechselwirkungen usw. dieses Bestandteils mit dem Bindungskoppler umfasst. Die vorliegende Erfindung umfasst auch solche Ausführungsformen, bei denen der Bestandteil zur Generierung einer Leukozytenstimulation und/oder Induktion einer immunologischen Toleranz sowohl an den Bindungskoppler gebunden ist, also auch teilweise ohne eine Bindung an den Bindungskoppler in die lösliche Matrix eingebettet ist.

25

Träger

Der Träger der erfindungsgemäßen Leukozytenstimulations-Matrix ist nicht besonders eingeschränkt, solange auf diesem eine lösliche Matrix gemäß der vorliegenden Erfindung aufgebracht werden kann. Bevorzugt ist der Träger aus einem biokompatiblen Material. Bevorzugt sind Träger, die Poren aufweisen.

Als duroplastische Trägermaterialien sind bspw. Polyurethane, Polyamid oder Polyester verwendbar, wobei Polyurethane bevorzugt sind. Unter den Polyurethanen sind offenporige

hydrophile, aber auch hydrophobe Polyurethan-Schäume verwendbar, die wahlweise Pigmente, z.B. Kohlenstoffpigmente und/oder Siliciumdioxidpigmente, enthalten können.

- 5 Weiterhin können als Polyurethane (PU) PU-Lacke verwendet werden oder andere Halbzeuge, die ebenfalls wahlweise Pigmente wie oben erwähnt enthalten können. Besonders bevorzugt ist PU Medical Grade (bezogen von der Firma KCI). Als thermoplastische Trägermaterialien sind z.B. Polycarbonate oder Polystyrol geeignet. Ebenfalls verwendbar sind Polyethylene oder Polypropylene, wobei diese bevorzugt in Kombination mit haftvermittelnden Pigmenten kombiniert werden. Auch Elastomere sind verwendbar.
- 10
- 15

- 15 Weitere geeignete Polymere sind z.B. PTFE (Polytetrafluorethylen), Dacron oder Polymethylpentan.

- 20 Weiterhin bevorzugt sind Materialien, die in der Chirurgie als sich auflösendes Nahtmaterial verwendet werden (Englisch: sutures), wie beispielsweise Monocryl (Poliglecaprone 25, PDS-2 (Polydioxanon), Maxon (Polyglyconat), Vicryl (Polyglactin-910) und Dexon-Plus (Polyglycolsäure). Die Verwendung derartiger, sich in Körperflüssigkeiten, beispielsweise Vollblut, auflösenden Materialien, bietet den Vorteil, dass sich nach vollständiger Auflösung der äußeren Matrix bzw. Hülle auch der Träger nach und nach auflöst, so dass bei Verwendung des Leukozytenstimulations-Moduls bzw. der Leukozytenstimulations-Matrix als Transplantat dieses nicht notwendigerweise aus dem Körper entfernt werden muss.
- 25

- 30
- 35

Weiterhin ist als Trägermaterial Glas in sämtlichen möglichen Formen, z.B. Fasern, offenporig oder geschäumt, geeignet.

- 35 Ebenfalls sind Metalle als Träger geeignet, bevorzugt biokompatible Metalle oder mit biokompatiblen Metallen beschichtete Träger. Auch Naturstoffe, wie Därme, oder

biologische Materialien, wie Schwämme, sind erfindungsgemäß bevorzugt verwendbar.

5 Polymermaterialien, die Poren aufweisen, sind besonders bevorzugt, insbesondere Polyurethan. Die Poren können eine beliebige Größe aufweisen. Durchschnittliche Porengrößen im Bereich von 0,5 - 2 mm, insbesondere etwa 1 mm, sind bevorzugt.

10 Lösliche Matrix

Weiterhin umfasst die Leukozytenstimulations-Matrix der vorliegenden Erfindung eine auf dem Träger befindliche lösliche Matrix, in die ein oder mehrere in die Matrix eingebettete Bestandteile zur Generierung einer Leukozytenstimulation und/oder Induktion einer immunologischen Toleranz eingebettet sind. Der Begriff "löslich" bedeutet, so wie er in der vorliegenden Erfindung zur Beschreibung der löslichen Matrix verwendet wird, dass sich die lösliche Matrix in Vollblut innerhalb von Stunden bis zu wenigen Tagen auflöst.

20 Die lösliche Matrix (b) ist in einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung aus langkettigen Zucker-Verbindungen wie z.B. Stärke, Cellulose und/oder Glykogen einerseits, und Polyethylenglykol andererseits aufgebaut.

25 Erfindungsgemäß braucht aber keine langkettige Zuckerverbindung enthalten zu sein. PEG ist somit in einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung notwendiger Bestandteil der löslichen Matrix, und die langkettigen Zucker sind wahlweiser Bestandteil. In einer anderen bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung sind neben PEG keine langkettigen Zucker als Bestandteile der löslichen Matrix enthalten.

35 Die lösliche Matrix umfasst in der genannten Ausführungsform mit langkettigen Zuckerverbindungen bevorzugt 50-90 Gew.-%, bevorzugt 60-80 Gew.-%, langkettige Zuckerverbindung(en) und 10-50 Gew.-%, bevorzugt 20-40 Gew.-%, eines Polyethylen-

glykols, bezogen auf die Summe aus langkettiger Zucker-verbindung und Polyethylenglykol. Bei beiden genannten erfindungsgemäßen Ausführungsformen der löslichen Matrix kann gewährleistet werden, dass sich die lösliche Matrix innerhalb 5 von wenigen Stunden, bevorzugt etwa 4-12 Stunden, im Blut langsam auflöst. Grundsätzlich kann durch Steigerung des PEG-Anteils die Auflösung verlangsamt werden. Somit ist eine Steuerung der Auflösungszeit der löslichen Matrix durch Variation der Anteile an PEG und langkettiger Zucker-verbindung möglich.

Eine Steuerung der Auflösungszeit der löslichen Matrix kann weiterhin auch über das Molekulargewicht des PEG gesteuert werden. Als Polyethylenglykol (PEG) wird bevorzugt PEG mit einem Molekulargewicht im Bereich von 1-200 kD verwendet. 15 Bevorzugt ist ein Molekulargewichtsbereich von etwa 10 bis etwa 60 kD, weiterhin bevorzugt etwa 10-30kD, besonders bevorzugt etwa 30 kD. Es können auch modifizierte PEG verwendet werden, bspw. solche, bei denen PEG-Moleküle durch 20 Spacer verbunden sind. PEG wird bevorzugt als wässrige Lösung verwendet, wobei z.B. bei einem PEG von 15-20 kD Molekulargewicht etwa eine 1-10 Gew.-% Lösung verwendet wird, bevorzugt etwa 5 Gew.-%. Bei PEG mit kurzem Molekulargewicht (z.B. etwa 6 kD) kann die Konzentration bis zu 20 Gew.-% betragen, bei PEG mit größerem Molekulargewicht kann die 25 Konzentration auch darunter liegen. Die geeignete Konzentration kann vom Fachmann durch Versuche ermittelt werden. PEG kann auch an verschiedene Zytokine, wie bspw. Interferone (IFN), gekoppelt werden, wobei derartige PEG-30 Interferonprodukte ebenfalls im Rahmen der vorliegenden Erfindung als Bestandteil der löslichen Matrix verwendet werden können. Damit hat man die Möglichkeit, Zytokine als Leukozyten-stimulierende Mittel mit in die lösliche Matrix einzubeziehen.

Bestandteil zur Generierung einer Leukozytenstimulation
und/oder Induktion einer immunologischen Toleranz

Leukozytenstimulation bedeutet erfindungsgemäß, dass

5 bereits geprägte Immunzellen spezifisch in ihrer Immunantwort verstärkt werden. Der Begriff umfasst aber auch die Prägung ungeprägter (naiver) Immunzellen. Der Begriff Leukozyten umfasst B-Lymphozyten, T-Lymphozyten, Granulozyten und Neutrophile.

10 Unter Induktion einer Toleranz ist erfindungsgemäß zu verstehen, dass eine Anergie der Leukozyten gegenüber einem bestimmten Antigen induziert wird, d.h. eine Inaktivierung. Dabei werden Leukozyten mit einem Antigen stimuliert und

15 gleichzeitig kostimulatorische Moleküle inhibiert.

Als Bestandteil zur Generierung bzw. Auslösung bzw. Erzeugung einer Leukozytenstimulation und/oder Induktion einer immunologischen Toleranz können erfindungsgemäß z.B.

20 Antigene, Haptene, MHC-Moleküle, kostimulatorische Faktoren, Zellbestandteile und/oder Membranfragmente Antigen-präsentierender Zellen verwendet werden. Die Antigene brauchen dabei nicht vorher isoliert werden. Auch unversehrte oder weitgehend unversehrte Viren, Bakterien, Zellen oder

25 Hüllen hiervon, welche Antigene aufweisen, können als Bestandteil zur Generierung einer Leukozytenstimulation und/oder Induktion einer immunologischen Toleranz erfindungsgemäß verwendet werden. Es können auch inaktivierte Viren, Bakterien usw. verwendet werden. Die Inaktivierung

30 kann gemäß dem Fachmann bekannten Verfahren erfolgen, bspw. UV-Bestrahlung. Die Antigene, z.B. Peptide, die aus beispielsweise Viren-, Bakterien- oder Tumorzellpräparationen isoliert werden, können an MHC-Moleküle gekoppelt sein oder an die Membranbestandteile Antigen-präsentierender Zellen, wie

35 beispielsweise dendritischer Zellen (DC), der zu behandelnden Patienten (autologe Zellen) oder können von allogenen Spendern stammen. Der immunrelevante Anteil der löslichen

Matrix, d.h. der Teil, der eine Immunantwort hervorruft, kann erfindungsgemäß auch als immunstimulatorischer Komplex (IK) bezeichnet werden.

5 Bei dem Antigen kann es sich um ein synthetisches Antigen handeln, oder das Antigen wird aus Viren, Bakterien, Pilzen, Protozoen, Parasiten (z.B. Würmern), Tumoren, Allergenen, Zellkulturen oder aus körpereigenem Gewebe gewonnen. Das MHC-Molekül und/oder der kostimulatorische Faktor können aus 10 körpereigenem Gewebe gewonnen werden, aus Zellkulturen, oder diese können synthetisch hergestellt werden.

Eine Übersicht der kostimulatorischen Moleküle findet sich z.B. in Rothstein und Sayegh, Immunological Reviews 2003, 15 "T-cell costimulatory pathways in allo-graft reaction and tolerance". Diese sind erfindungsgemäß umfasst.

Erfindungsgemäß können in Anwesenheit von Antigen bevorzugt die folgenden kostimulatorischen Moleküle verwendet werden:

20 - Alle kostimulatorische Moleküle der CD28/CTLA-4:B7-Familie: CD28, CTLA-4, ICOS, PD-1, B7-1, B7-2, B7RP-1, PD-L1, PD-L2.

- Tumornekrosefaktoren: Tumornekrosefaktorrezeptorfamilie: 25 CD154/CD40L, 4-IBB (CD137), Ox-40 (CD134), CD27; Liganden: CD40, 4IBBL (CD137L), Ox40L (CD134L), CD70.

Weitere kostimulatorische Moleküle, die noch gefunden werden, sind ebenfalls umfasst.

30 Bevorzugt ist der Bestandteil zur Generierung einer Leukozytenstimulation und/oder Induktion einer immunologischen Toleranz, z.B. gegenüber einem Virus, ein Virus der Familie der Herpesviren, insbesondere das Cytomegalievirus (CMV), 35 Epstein Barr Virus (EBV) oder Herpes Simplex Virus (HSV 1+2), oder ein Fragment oder Teil, eine Virushülle oder ein Virus-

hüllenfragment hiervon, die Antigene enthalten, welche eine Immunantwort hervorrufen können.

Weiterhin sind verwendbar: SARS (Coronavirus); Rhinovirus;

5 Picornaviren, insbesondere Poliovirus, Coxsackievirus, Retroviren, insbesondere das humane Immundefizienz Virus (HIV), ein Hepatitis auslösendes Virus, insbesondere Hepatitis B Virus (HBV) oder Hepatitis C Virus (HCV),

10 Coronaviren, insbesondere SARS-assoziierte Coronaviren; und/oder jeweils Antigene hiervon oder ein Fragment oder Teil, eine Virushülle oder ein Virushüllenfragment hiervon, die Antigene enthalten, welche eine Immunantwort hervorrufen können.

15 Weiterhin sind erfindungsgemäß alle anderen Viren, die mit chronischen Entzündungskrankheiten oder Tumorerkrankungen verbunden sind, Orthomyxoviren (Influenza), Paramyxoviren (Mumps, Masern bei fehlender oder nicht ausreichender

20 Impfung), Papovaviren (Papillomaviren) verwendbar. Auch Viren, gegen die keine Impfung existiert und/oder mit akuter Pathogenität/Lethalität sind einsetzbar.

25 Besonders geeignet ist die erfindungsgemäße Leukozyten-stimulations-Matrix für bei Patienten verwendbar, bei denen eine antivirale Chemotherapie nicht greift (z.B. Resistenzen entwickelt wurden) oder lokale Virus-vermittelte Entzündungen durch systemische Behandlung nicht erreicht werden (z.B. CMV-Retinitis).

30 Besonders bevorzugt ist das Antigen ein Cytomegalievirus des Stamms CMV Hi91, AD169, Towne, Davis oder die Hülle, ein Teil oder Fragment hiervon. Andere Labor- oder Wildstämme sind aber ebenfalls umfasst.

Als Virentypen können RNA-Viren, DNA-Viren, Viren mit Hüllen, Viren ohne Hüllen, onkogene Viren (Papilloma-Virus), HHV-8 u.s.w. verwendet werden.

- 5 Im Fall einer Antibiotika-Unverträglichkeit, Resistenzen oder lokalen Bakterien-induzierten lokalen Entzündungen können erfindungsgemäß Bakterien oder Teile bzw. Fragmente hiervon, die Antigene enthalten, verwendet werden.
- 10 Grundsätzlich sind alle Spezies aus den Familien bzw. Gattungen der Staphylokokken; Streptokokken; Enterokokken; Neisserien; Enterobakterien; Vibrionen (Cholera); alle nichtfermentierenden Bakterien; Campylobacter; Helicobacter; Haemophilus; Bordetellen; Legionellen; alle Anthrozoonose-erreger; Korynebakterien; Bacillus; Clostridien; Mykobakterien; Nocardien; Treponemen; Borrelien (bevorzugt zeitlich nahe Testung bei Patienten mit Borreliose); Leptospiren; Bartonella; Mykoplasmen; Chlamydien verwendbar.
- 15
- 20 Unter den Pilzen sind insbesondere Sprosspilze (Candida); Fadenpilzer (Schimmelpilze, Aspergillus); Dimorphe Pilze; und andere wie Pneumocystis carinii verwendbar, bevorzugt humanpathogene Pilze und sogenannte "Krankenhauskeime" wie Aspergillus oder Candida albicans.
- 25 Unter den Parasiten sind insbesondere Protozoen; Trematoden; Cestoden; Nematoden erfindungsgemäß einsetzbar.
- 30 Auch Prionen oder noch nicht bekannte oder definierte Pathogene sind grundsätzlich einsetzbar.

Im Fall von Tumoren können insbesondere Membranbestandteile inaktivierter Tumorzellen, besonders des malignen Melanoms, verwendet werden.

Bei Autoimmunerkrankungen/Allergien können grundsätzlich erfindungsgemäß alle derzeit und zukünftig bekannten relevanten Antigene, besonders Kollagen, Zellmembranen von biliären Epithelzellen etc. verwendet werden.

5

Ein bevorzugter inhibitorischer Faktor, der bei der Erzeugung einer Immuntoleranz verwendet werden kann, ist LIR-1.

Die Konzentration des Bestandteils zur Generierung einer 10 Leukozytenstimulation und/oder Induktion einer immunologischen Toleranz in der Hülle kann vom Fachmann durch geeignete Versuche ermittelt werden. Bevorzugt richtet sich die Menge bzw. Konzentration dieses Bestandteils bei Einbringen 15 in den Körper nach den in herkömmlichen Impfungen verwendeten Mengen. Bei herkömmlichen Impfungen werden beispielsweise etwa 20 µg Virusantigen verwendet.

Insgesamt ist die lösliche Matrix zusammen mit dem eingebetteten Antigen erfindungsgemäß bevorzugt in etwa wie folgt 20 aufgebaut:

Definition der Matrix (Gew.-%):

	Möglicher Bereich	Bevorzugter Bereich
Summe aus PEG und		
langkettigem Zucker	99,5-99,999 Gew.-%	99,9-99,99 Gew.-%
Antigen	0,001-0,5 Gew.-%	0,01-0,1 Gew.-%

25 Wird statt eines im wesentlichen isolierten Antigens ein ganzes Virus, Bakterium, eine Hülle hiervon oder dergleichen verwendet, kann der oben angegebene Antigenanteil auch mehr als 0,5 Gew.-% oder 0,1 Gew.-% betragen

30 Wie oben bereits erwähnt, liegt ein langkettiger Zucker dabei nicht notwendigerweise vor. Die Verteilung aus PEG und langkettiger Zuckerverbindung beträgt in einer bevorzugten Aus-

führungsform jedoch 50-90 Gew.-%, bevorzugt 60-80 Gew.-%, langkettige Zuckerverbindung(en) und 10-50 Gew.-%, bevorzugt 20-40 Gew.-%, eines Polyethylenglykols, bezogen auf die Summe aus langkettiger Zuckerverbindung und Polyethylenglykol.

5

Bindungskoppler

In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist ein Bindungskoppler vorgesehen, um eine Bindung zwischen Träger und dem einen oder mehreren Bestandteilen zur 10 Generierung einer Leukozytenstimulation und/oder Induktion einer immunologischen Toleranz zu vermitteln. Bei diesem Bindungskoppler, der bevorzugt eine kovalente Bindung vermittelt, handelt es sich vorzugsweise um ein Element, das aus Cyanogenbromid, Cyanoborhydrid, Agarose, Agarosederiva- 15 ten, Silan, Silanderivaten oder Kombinationen hiervon ausgewählt ist. In einer weniger bevorzugten Ausführungsform kann auch p-Toluolsulfonylchlorid verwendet werden. Besonders bevorzugt ist das Silanderivat ein Alkoxysilan, noch bevorzugter ein Anhydridoalkoxysilan oder ein anderes 20 Alkoxysilan, welches mindestens eine Carboxylgruppe aufweist. Die Alkoxygruppe ist jeweils bevorzugt eine Methoxy- oder Ethoxygruppe. Ein besonders bevorzugtes Anhydridoalkoxysilan ist 3-(Triethoxysilyl)propylbernsteinsäureanhydrid (GENIOSIL ® GF 20, Wacker). Auch Aminogruppen enthaltende Alkoxysilane 25 sind verwendbar, z.B. (3-Aminopropyl)trimethoxysilan oder [3-(2-Aminoethylamino)propyl] trimethoxysilan. Weiterhin bevorzugt ist (3-(2,3-Epoxypropoxy)propyl)trimethoxysilan (GENIOSIL® GF 80). Weiter Alkoxysilane können entsprechend der jeweiligen Träger und Bedingungen vom Fachmann ausgewählt 30 werden.

Es hat sich herausgestellt, dass Alkoxysilane, insbesondere Anhydridoalkoxysilane wie GENIOSILE® GF 20, aber auch GENIOSILE® GF 80, besonders gut zur Vermittlung einer Bindung an einen Polyurethan- oder Glasträger geeignet sind.

Die Erfindung erlaubt die zeitlich limitierte Bindung von Leukozyten aus Vollblut oder aus Vollblut isolierten Leukozyten, deren spezifische Antigenstimulation und die Rückführung der stimulierten Leukozyten in den Blutkreislauf 5 durch Auflösung der Matrix im Vollblut bzw. einer Leukozyten enthaltenden physiologischen Flüssigkeit.

Weiterhin ist erfindungsgemäß die Induktion einer immunologischen Toleranz durch die Zugabe inhibitorischer Faktoren 10 bei gleichzeitiger spezifischer Aktivierung möglich. Die Zugabe inhibitorischer Faktoren kann beispielsweise während der Bildung der löslichen Matrix erfolgen, d.h. die inhibitorischen Faktoren werden mit in die lösliche Matrix eingebettet, oder es kann eine Zugabe während der Leukozyten- 15 stimulation erfolgen. Die inhibitorischen Faktoren können auch über einen der oben genannten Bindungskoppler in die lösliche Matrix eingebettet werden. Im Fall einer Induktion einer immunologischen Toleranz wird ein Leukozyt zwar mit dem Antigen in Kontakt gebracht, kann aber durch die Einwirkung 20 der inhibitorischen Faktoren gegen die Antigene nicht aktiv werden. Ein geeigneter inhibitorischer Faktor ist beispielsweise LIR-1. Weitere inhibitorische Faktoren sind dem Fachmann bekannt und durch die Erfindung umfasst. Auch inhibitorische Faktoren, die noch gefunden werden, sind erfindungs- 25 gemäß umfasst.

Die erfindungsgemäße Leukozytenstimulations-Matrix kann auch als Implantat verwendet werden.

30 Leukozytenstimulationsmodul

Die Leukozytenstimulations-Matrix gemäß der vorliegenden Erfindung kann in einem Leukozytenstimulations-Modul eingesetzt werden. Das Leukozytenstimulations-Modul umfasst 35 ein Gehäuse, welches bevorzugt aus Glas oder einem Kunststoff hergestellt ist, wobei der Kunststoff bevorzugt untoxisch und

gegenüber einer biologischen Flüssigkeit wie Vollblut inert, d.h. im wesentlichen unlöslich, ist. Das Leukozyten-
stimulations-Modul umfasst mindestens eine Öffnung. Bevorzugt
ist mindestens eine Einlassöffnung und mindestens eine
5 Auslassöffnung vorgesehen, weiterhin bevorzugt genau eine
Einlassöffnung und genau eine Auslassöffnung. Das Gehäuse
bzw. Modul kann aber auch auf andere Weise ausgestaltet sein,
beispielsweise nur mit einer Öffnung, durch welche eine
Leukozyten enthaltende Flüssigkeit einströmt und auch wieder
10 ausströmt. Weitere Ausgestaltungen des Moduls können vom
Fachmann konstruiert werden, bspw. solche mit mehr als einer,
z.B. zwei Eingangsöffnungen und/oder Ausgangsöffnungen.

Weiterhin betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren
15 zur Leukozytenstimulation und/oder Induktion einer immunolo-
gischen Toleranz, wobei eine Leukozyten enthaltende Flüssig-
keit, wie beispielsweise Vollblut, mit einer Leukozyten-
stimulations-Matrix der vorliegenden Erfindung in Kontakt
gebracht wird. Bevorzugt erfolgt dieses Kontaktieren in einem
20 Leukozytenstimulations-Modul gemäß der vorliegenden
Erfindung. Weiterhin bevorzugt erfolgt dieses Kontaktieren im
Blutstrom eines Patienten, d.h. *in vivo*.

Das erfindungsgemäße Modul kann bei Patienten bzw. in
25 klinischen Situationen mit mangelnder zellulärer Immunantwort
z. B. gegen virale oder bakterielle Infektionserreger oder
Tumorantigene eingesetzt werden.

Das erfindungsgemäße Modul kann beispielsweise in den
30 Blutstrom des Patienten eingesetzt werden. Eine bevorzugte
Ausführungsform besteht darin, dass das Modul zum transienten
Einbringen in den Patienten-Blutstrom über einen Sheldon-
Katheter eingesetzt wird. Dabei binden zirkulierende Antigen-
spezifische T-Zellen an die in die Matrix eingebetteten
35 Bestandteile, werden dort zeitweise gebunden, stimuliert und
verlassen als hochaktive Zellen das Modul. Effektorzellen mit

nur unzureichender spezifischer Funktion werden stimuliert und verlassen als hoch aktive Zellen das Modul. Gedächtniszellen, die zuvor Kontakt mit dem in die lösliche Matrix eingebetteten Bestandteil hatten, binden ebenfalls an die

5 Matrix. Auch diese bereits geprägten Zellen werden stark aktiviert. Weiterhin können ungeprägte (naive) T-Zellen an die Matrix binden und werden gegen das präsentierte Antigen MHC-Molekül, kostimulatorischen Faktor oder anderen Zellbestandteil geprägt. Durch kostimulatorische Faktoren,

10 die dem Modul wahlweise beigegeben werden können, oder die ebenfalls in die lösliche Matrix eingebettet werden (z.B. DC-Adhäsionsmoleküle, Zytokine etc.), kommt es zur Aktivierung dieser Zellen, die zurück in den Blutkreislauf gelangen, um dort mittels spezifischer Effektormechanismen

15 das Pathogen zu eliminieren. Die Induktion einer humoralen Immunantwort kann sich anschließen (T-Zell-vermittelte B-Zellaktivierung).

Eine Immuntoleranz kann wie oben beschrieben durch Anwendung

20 einer entsprechenden Matrix, in die inhibierende Faktoren eingebettet sind, in dem Modul erreicht werden, oder indem inhibierende Faktoren während der Leukozytenstimulation in das Modul gegeben werden.

25 Durch Auflösung der löslichen Matrix werden gebundene stimulierten Leukozyten wieder freigesetzt und gelangen in den Körper. Gleichzeitig gelangen durch das Auflösen der Matrix tiefer liegende Schichten der Matrix mit antigenen Determinanten an die Oberfläche, und neue unbesetzte Bindungsstellen

30 werden frei. Der Vorgang der Antigenvermittelten Leukozytenbindung und -stimulation läuft ununterbrochen weiter, bis keine lösliche Matrix mehr vorhanden ist.

35 Vorteilhafterweise kann durch Einsatz des erfindungsgemäßen Moduls die Akkumulation von Leukozyten und ein immunstimulierender Mechanismus in einem definierten Volumen erreicht

werden. Bei einer ex vivo-Anwendung gemäß Stand der Technik werden stimulierte Leukozyten in den Körper des Patienten zurückgegeben, wobei die Verteilung der stimulierten Leukozyten nach der Rückgabe vollkommen unklar ist.

5

Durch den Einsatz des Leukozytenstimulations-Moduls (d.h. insbesondere durch Einbringen in den Blutstrom des Patienten), oder auch durch ex vivo-Inkubation der Matrix mit Vollblut des Patienten, binden zirkulierende Leukozyten, z.B.

10 T-Zellen, spezifisch an die äußere Schicht der löslichen Matrix. Die erfindungsgemäße Zusammensetzung der löslichen Matrix bedingt den sukzessiven Abbau der äußeren Schichten.

Dadurch werden auch gebundene und stimulierte Leukozyten vom Festkörper abgelöst und werden durch den Blutfluss oder durch 15 mechanische Behandlung (z.B. Schütteln) dem Blut

zurückgeführt. Das Ablösen der äußeren Schicht der Hülle bewirkt die Erneuerung der immunogenen Oberfläche. Leukozyten können an die neu an der Oberfläche erschienenen immunstimulatorischen Komplexe, Antigene, Zellbestandteile,

20 MHC-Moleküle etc. binden. Der Vorgang wiederholt sich solange, bis die Hülle vollständig aufgelöst ist. Die abgelösten Bestandteile sind in Blut untoxisch und ungefährlich, da es sich ausschließlich um biokompatibles Material und/oder autologe Bestandteile des Patienten

25 handelt. Die möglicherweise weiterbestehende Immunogenität der zirkulierenden immunstimulatorischen Komplexe im Blut ist zusätzlich von Vorteil, da es bis zu deren biologischem Abbau zur weiteren antigenspezifischen Immunstimulation im Patienten kommt.

30

Das Modul weist bevorzugt ein Kunststoffgehäuse mit bevorzugt etwa 5 bis 500 ml Volumen auf. Ein- und Ausströmungsstutzen werden im Durchmesser an die Schlauchverbindungen der Katheter-Anschlüsse angepasst. Der Katheter kann doppellumig

35 (z.B. ein Sheldon-Katheter) sein, so dass es ermöglicht wird, die Fließgeschwindigkeit des Blutes pro Lumen um bis zu 50%

zu vermindern. Das Gehäuse beinhaltet die erfindungsgemäße Leukozytenstimulations-Matrix.

Bei Bedarf kann das Leukozytenstimulations-Modul als 5 funktionelle Einheit nach Befüllung mit Blut des Patienten von den Katheterverbindungen abgekoppelt werden, um z.B. weitere Modifikation ex vivo vorzunehmen (z.B. Zugabe von kostimulatorischen Faktoren, Zytokinen, Hormonen, 10 inhibierenden Faktoren usw.), ohne dabei das Blut aus dem Modul zu entnehmen. Das mit Blut gefüllte Gehäuse kann für einige Stunden bei stetiger Bewegung und Temperaturen über 30°C inkubiert werden, um es dann nach dem Patienten über den bereits liegenden Katheter direkt aus dem Leukozyten- 15 stimulations-Modul zurück zuzuführen. Dies kann auch mehrfach wiederholt werden.

Vorteile der Erfindung

Es existieren derzeit keine Verfahren zur zeitlich kontrollierten antigenspezifischen Leukozytenstimulation im Blutfluss bzw. im Vollblut oder allgemein in Leukozyten 20 enthaltenden Flüssigkeiten. Durch die vorliegende Erfindung konnte das Problem gelöst werden, dass bei der Stimulation von Leukozyten über immobilisierte Antigene gemäß Stand der 25 Technik eine derartig stabile Bindung an den Festkörper stattfindet, dass eine Ablösung der Leukozyten nicht mehr gewährleistet ist. Im Blutkreislauf kann dies zur Anhäufung der Leukozyten innerhalb des eingesetzte Moduls gemäß Stand der Technik führen. Die Folge ist eine Erhöhung des 30 Widerstands und spezifischer Stress für die Leukozyten, unerwünschte Nebenreaktionen, erhöhte Gerinnungseffekte. Die kontinuierliche Rückführung der stimulierten Leukozyten in den Blutkreislauf gemäß der vorliegenden Erfindung ermöglicht die Lösung der obengenannten Schwierigkeiten.

Das Leukozytenstimulations-Modul bzw. die Leukozytenstimulations-Matrix gemäß er vorliegenden Erfindung können bei der Therapie gegen virale chronische Infektionserkrankungen eingesetzt werden. Die Chronizität basiert auf der

- 5 Persistenz des Antigens im Gewebe und deren unzureichenden Immunantwort dagegen. Virale Erkrankungen werden zumeist mit Chemotherapeutika therapiert. Dies hat häufig eine Reminiszenzbildung der Nieren und starke Nebenwirkungen zur Folge. Durch die vorliegende Erfindung können *de novo* eine
- 10 Induktion bzw. Verstärkung einer hoch-spezifischen Immunantwort gegen ein Pathogen gewährleistet werden.

Durch die Bindung an den oder die Bestandteile zur Generierung einer Leukozytenstimulation und/oder Induktion

- 15 einer immunologischen Toleranz können bereits geprägte Immunzellen spezifisch in ihrer Immunantwort verstärkt werden. Diese in niedriger Frequenz im Blut enthaltenen Zellen müssen dabei nicht aufwendig isoliert und *ex vivo* expandiert werden, da die Zellen über den Blutstrom
- 20 automatisch in das Leukozytenstimulations-Modul gelangen und dort stimuliert werden. Nach ihrer Aktivierung gelangen die Leukozyten durch die Auflösung der löslichen Matrix als Effektorzellen direkt in den Blutkreislauf und in die betroffenen Gewebe. Durch die physiologische Umgebung im
- 25 Blutstrom ist gewährleistet, dass alle notwendigen Faktoren für eine Ausreifung zu hochaktiven Effektorzellen vorhanden sind.

Überdies können gemäß der vorliegenden Erfindung auch

- 30 Neuimmunisierungen vorgenommen werden und Toleranzinduktionen hervorgerufen werden.

Die Erfindung betrifft weiterhin die Verwendung einer erfindungsgemäßen Leukozytenstimulations-Matrix oder eines erfindungsgemäßen Leukozytenstimulations-Moduls zur Leukozytenstimulation und/oder Induktion einer immunolo-

gischen Toleranz, sowie deren Verwendung in Nachweisverfahren der Verteilung aktiverter T-Zell-Subtypen oder für Impfungen.

5 Die vorliegende Erfindung wird im folgenden anhand von Ausführungsbeispielen beschrieben, die den Umfang der vorliegenden Erfindung jedoch nicht beschränken sollen.

10 1. Ausführungsform mit in der löslichen Matrix einge-
betteten Antigenen

Der Cytomegalievirusstamm Hi91 wurde in humanen kultivierten Vorhautfibroblasten gezüchtet. Nach Auftreten des zytopathischen Effekts wurden die Zellkulturüberstände gesammelt, 15 die Viren mittels Ultrazentrifugation angereichert, mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (0,1 M PBS mit Ca^{2+} , Mg^{2+} , pH 7,4) gewaschen und mittels UV-Bestrahlung inaktiviert. Die Viren wurden mit 100 μl Natriumbicarbonat-Puffer (50 mM; pH 8,0-9,6), der 5 Gew.-% 15-20 kD PEG (Produkt Nr. P2263, 20 Sigma-Aldrich, 2,2'-(*[*Methylethyliden]-bis[4,1-penylen-oxymethylen]-bis-oxiran-Polymer mit α -Hydroxypoly(oxy-1,2-ethandiyl) enthielt, kurz (3-5 Minuten) bei Raumtemperatur inkubiert (PEGiliert). 10 mg offenporiger Polyurethan (PU)-Schaum (PU Medical Grade, Firma KCI) wurden mit den in der 25 Reaktionsmischung enthaltenen PEGilierten Viren bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend getrocknet.

Dabei wurden 20 μl der Antigenpräparation (CMV Hi91) beige-
mischt. Für die Stimulationsversuche wurde Antigen von 1×10^6 -
30 1×10^7 Viren verwendet. Anschließend wurde Vollblut (500 μl) eines CMV positiven Spenders mit bekannter nachweisbarer dauerhafter CMV-spezifischer zellulärer Immunaktivität den vorbehandelten Materialproben zugegeben, und es wurde für eine Stunde in Bewegung bei 37° C inkubiert.

Nach dem Waschen der Träger mit dem obigen Natriumbicarbonatpuffer wurde das Blut für die durchflusszytometrische Analyse (FACS) zum Nachweis von *de novo* generierten proinflammatorischen Zytokinen in T-Zellen (CD4 und CD8) vorbereitet. Für 5 den Nachweis der T-Zell Aktivierung (CD69/IFN- γ) wurde ein käuflicher Standard-Testkit (Becton Dickinson) verwendet.

2. Ausführungsformen mit kovalent gebundenen Antigenen

10 Die Versuche wurden wie oben unter 1. beschrieben durchgeführt. Allerdings wurde das Antigen nicht zusammen mit PEG zugegeben, sondern der PU-Schaum wurde vor Kontaktieren mit PEG und der Cellulose für 1-2 Stunden mit dem Bindungskoppler 3-(Triethoxsilyl)propylbernsteinsäureanhydrid (5 % 15 Geniosil® GF20 in Methanol) vorbehandelt. Anschließend wurden wie oben vorbereitete Antigene aus der Hülle des Cytomegalievirus auf die Trägermaterialien durch Inkubation kovalent gebunden.

20 Ergebnisse:

Sowohl kovalent gebundene als auch in der löslichen Matrix eingebettete Antigene konnten im Vollblut eine T-Zell vermittelte Immunantwort auslösen. Der Träger mit den 25 kovalent gebundenen Antigenen zeigte nach mehrfach hintereinander wiederholten Ansätzen eine zunehmend abgeschwächte Immunreaktion (CD69/IFN- γ). Dagegen war die generierte Immunreaktion mittels löslicher Matrix über die Zeit konstant. Abbildung 1 zeigt beispielhaft eine 30 Darstellung der durchflusszytometrischen Versuchsergebnisse zur Stimulation der CMV-spezifischen Immunantwort (Aktivierungsmarker CD69/Interferon-gamma Produktion) mittels kovalent gebundener CMV-Antigene (Polyurethan KCI Medical Grade mit Silan (5% Geniosil® in Methanol) vorbehandelt) 35 sowie nicht kovalent eingebetteter CMV-Antigene. Die Ausschüttung der Zytokine wurde durch Vorbehandlung der

Zellen mit Brefeldin A gehemmt. Die Quadrantenanalyse zeigt nach Abzug der Kontrollwerte (0,02 % unstimulierte Zellen) eine spezifische Aktivierung bei 2,49 % der Lymphozyten (CD4⁺).

5

Auf einem Träger kovalent oder in einer löslichen Matrix eingebettete Antigene können somit eine spezifische T-Zell vermittelte Immunantwort im Vollblut auslösen. Die lösliche Matrix führt zu einer kontinuierlichen Erneuerung der Antigen 10 stimulierenden Komponente, die im Kontakt mit dem Blut ist. Blutbestandteile können demnach die funktionelle Kapazität nicht inhibieren.

Fig. 1.a und b: Durchflusszytometrische Ergebnisse, als 15 Quadranten-analyse dargestellt. Die Punktewolke im Kasten rechts oben repräsentiert jeweils die durch CMV-HI91-Antigen aktivierten (CD69/IFN- γ)CD4+ Zellen im Vollblut eines gesunden CMV-positiven Spenders.

- A) unstimulierte Kontrolle: 0.02 %
- 20 B) CMV-Hi91-Antigen auf mit Silan behandeltem Polyurethan: 2.49 %
- C) CMV-Hi91-Antigen auf mit Silan behandeltem Polyurethan (Wiederholung): 0.75 %
- D) CMV-Hi91-Antigen auf löslicher Matrix (nach 25 Wiederholung): 2.02 %

Obige Versuche wurden auch mit anderen Trägern wiederholt, d.h. mit Sepharose, Glas und Polystyrol, wobei vergleichbare 30 Ergebnisse erzielt wurden.

Patentansprüche

1. Leukozytenstimulations-Matrix zur Leukozyten-stimulation und/oder Induktion einer immunologischen Toleranz, mit folgenden Bestandteilen:
 - a) ein oder mehreren Trägern,
 - b) einer löslichen Matrix zur Einbettung eines oder mehrerer Bestandteile zur Generierung einer Leukozyten-stimulation und/oder Induktion einer immunologischen Toleranz,
 - c) ein oder mehreren in die lösliche Matrix eingebetteten Bestandteilen zur Generierung einer Leukozyten-stimulation und/oder Induktion einer immunologischen Toleranz.
2. Leukozytenstimulations-Matrix nach Anspruch 1, wobei zusätzlich ein oder mehrere Bindungskoppler vorgesehen sind, um eine Bindung zwischen Träger und den ein oder mehreren Bestandteilen zur Generierung einer Leukozyten-stimulation und/oder Induktion einer immunologischen Toleranz zu vermitteln.
3. Leukozytenstimulations-Matrix nach Anspruch 2, wobei die Bindung eine kovalente Bindung ist.
4. Leukozytenstimulations-Matrix nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Bestandteil zur Generierung einer Leukozytenstimulation und/oder Induktion einer immunologischen Toleranz aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus Antigenen, MHC-Molekülen, kostimulatorischen Faktoren, Zellbestandteilen, Zellhüllen, Bakterien, Viren und Kombinationen hiervon besteht.
5. Leukozytenstimulations-Matrix nach Anspruch einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Bestandteil zur

Generierung einer Leukozytenstimulation und/oder Induktion einer immunologischen Toleranz ein synthetisches Antigen ist, oder aus Viren, Bakterien, Pilzen, Tumoren, Allergenen oder aus körpereigenem Gewebe gewonnen wird, und/oder das MHC-5 Molekül und der kostimulatische Faktor aus körpereigenem Gewebe, aus Zellkulturen und/oder synthetisch gewonnen werden.

6. Leukozytenstimulations-Matrix nach Anspruch 4 oder 10 5, wobei der Bestandteil zur Generierung einer Leukozytenstimulation und/oder Induktion einer immunologischen Toleranz ein Virus der Familie der Herpesviren oder ein Fragment hiervon ist, bevorzugt das Cytomegalievirus oder ein Fragment 15 hiervon.

7. Leukozytenstimulations-Matrix nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Träger aus Gruppe ausgewählt ist, die aus Polyurethanen, Polycarbonaten, Polystyrol, in der Chirurgie verwendeten, sich auflösenden 20 Materialien, Glas, Naturstoffen wie Därmen oder biologischen Materialien wie Schwämmen, oder Kombinationen hiervon besteht.

8. Leukozytenstimulations-Matrix nach einem der 25 vorhergehenden Ansprüche 2 bis 7, wobei der Bindungskoppler aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus Cyanogenbromid, Cyanoborhydrid, Agarose, Agarosederivaten, Silan, Silan-derivaten oder Kombinationen hiervon besteht.

9. Leukozytenstimulations-Matrix nach Anspruch 8, 30 wobei das Silanderivat ein Alkoxysilan ist, bevorzugt ein Anhydridoalkoxysilan oder ein anderes Alkoxysilan, welches mindestens eine Carboxylgruppe aufweist.

10. Leukozytenstimulations-Matrix nach einem der 35 vorhergehenden Ansprüche, wobei die lösliche Matrix aus

langkettigen Zuckerverbindungen wie Stärke, Cellulose, Glykogen einerseits, und/oder Polyethylenglykol andererseits aufgebaut ist.

5 11. Leukozytenstimulations-Matrix nach Anspruch 10, wobei die lösliche Matrix aus 50-90 Gew.-%, bevorzugt 60-80 Gew.-%, der langkettigen Zuckerverbindung und 10-50 Gew.-%, bevorzugt 20-40 Gew.-%, Polyethylenglykol, bezogen auf die Summe aus langkettiger Zuckerverbindung und Polyethylen-
10 glykol, aufgebaut ist.

12. Leukozytenstimulations-Modul, umfassend ein Gehäuse mit mindestens einer Öffnung sowie eine darin befindliche Leukozytenstimulations-Matrix nach einem der vorhergehenden
15 Ansprüche.

13. Leukozytenstimulations-Modul nach Anspruch 12, umfassend mindestens eine Einlassöffnung und mindestens eine Auslassöffnung, bevorzugt eine Einlassöffnung und eine
20 Auslassöffnung.

14. Verfahren zur Leukozytenstimulation und/oder Induktion einer immunologischen Toleranz, dadurch gekennzeichnet, dass eine Leukozyten enthaltende Flüssigkeit mit einer Leukozytenstimulations-Matrix nach einem der
25 Ansprüche 1 bis 11 in Kontakt gebracht wird.

15. Verfahren nach Anspruch 14, wobei das Kontaktieren in einem Leukozytenstimulations-Modul nach Anspruch 12 oder
30 13 erfolgt.

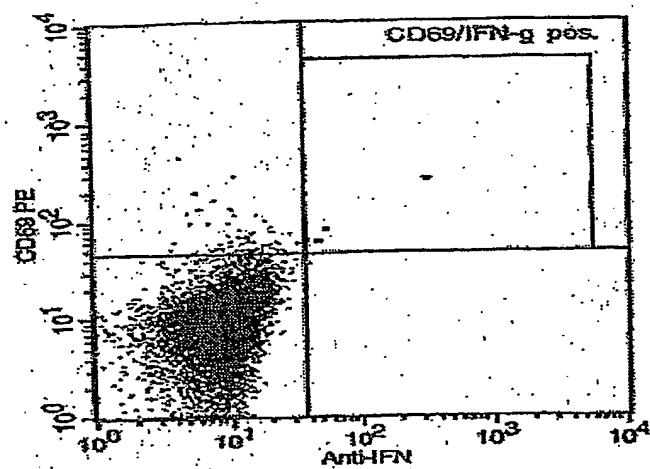
16. Verwendung einer Leukozytenstimulations-Matrix nach einem der Ansprüche 1 bis 11 oder eines Leukozytenstimulations-Moduls nach Anspruch 12 oder 13 zur Leukozytenstimulation und/oder Induktion einer immunologischen Toleranz.
35

17. Verwendung einer Leukozytenstimulations-Matrix nach einem der Ansprüche 1 bis 11 oder eines Leukozytenstimulations-Moduls nach Anspruch 12 oder 13 in Nachweisverfahren der Verteilung aktiverter T-Zell-Subtypen oder für

5 Impfungen.

1/2

A



B

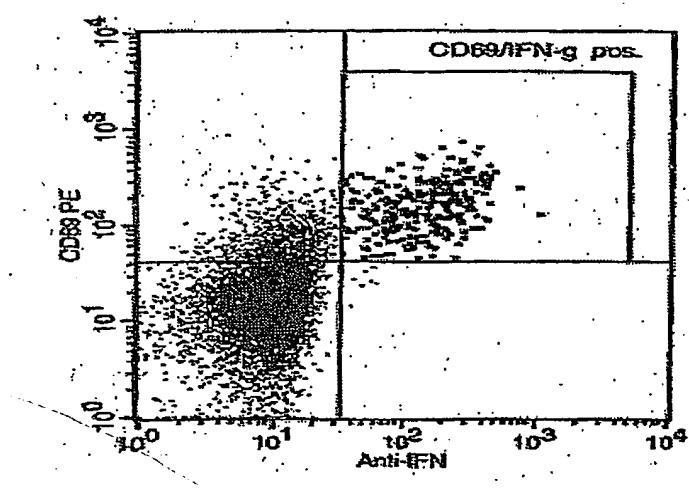
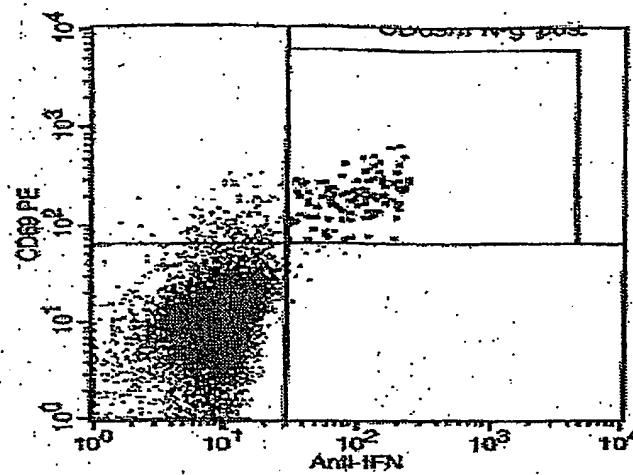


Fig. 1.a

2/2

C



D

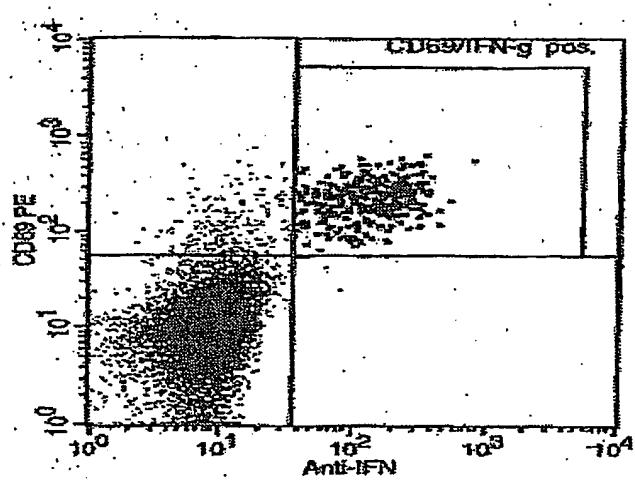


Fig. 1.b

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2005/002325

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12N5/00 C12N5/08 C12N5/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12N A61L

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 03/030965 A (SCHOLZ MARTIN) 17 April 2003 (2003-04-17) cited in the application the whole document -----	1-17
Y	WO 96/27657 A (MASSACHUSETTS INST TECHNOLOGY) 12 September 1996 (1996-09-12) abstract page 6, line 27 - page 7, line 2 page 8, line 29 - page 9, line 14 page 12, line 1 - line 9 ----- -/-	1-17

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the International search

Date of mailing of the International search report

1 September 2005

09/09/2005

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Noë, V

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2005/002325

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2004/006951 A (OELKE MATHIAS ; SCHNECK JONATHAN (US); UNIV JOHNS HOPKINS (US)) 22 January 2004 (2004-01-22) abstract paragraphs '0007!, '0014!, '0015!, '0032!, '0039!, '0055!, '0084! - '0107!, '0166! paragraphs '0007!, '0014!, '0015!	1-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

EP2005/002325

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Insofar as claims 14-17 relate to a method for treatment of the human or animal body (EPC Article 52(4)), the search was carried out on the basis of the alleged effects of the compound or composition.
2. Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No	
PCT/EP2005/002325	

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 03030965	A 17-04-2003	WO DE	03030965 A2 10294532 D2	17-04-2003 26-08-2004
WO 9627657	A 12-09-1996	US WO US US	2004214997 A1 9627657 A1 6045818 A 5906828 A	28-10-2004 12-09-1996 04-04-2000 25-05-1999
WO 2004006951	A 22-01-2004	AU CA EP WO US	2003256506 A1 2493081 A1 1551449 A1 2004006951 A1 2004115216 A1	02-02-2004 22-01-2004 13-07-2005 22-01-2004 17-06-2004

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2005/002325

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12N5/00 C12N5/08 C12N5/06

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 C12N A61L

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ^a	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	WO 03/030965 A (SCHOLZ MARTIN) 17. April 2003 (2003-04-17) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1-17
Y	WO 96/27657 A (MASSACHUSETTS INST TECHNOLOGY) 12. September 1996 (1996-09-12) Zusammenfassung Seite 6, Zeile 27 – Seite 7, Zeile 2 Seite 8, Zeile 29 – Seite 9, Zeile 14 Seite 12, Zeile 1 – Zeile 9	1-17

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- ^a Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem Internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchebericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *P* Veröffentlichung, die vor dem Internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem Internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

& Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche

Absendedatum des Internationalen Recherchenberichts

1. September 2005

09/09/2005

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL – 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Noë, V

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2005/002325

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	<p>WO 2004/006951 A (OELKE MATHIAS ; SCHNECK JONATHAN (US); UNIV JOHNS HOPKINS (US)) 22. Januar 2004 (2004-01-22)</p> <p>Zusammenfassung Absätze '0007!, '0014!, '0015!, '0032!, '0039!, '0055!, '0084! - '0107!, '0166! Absätze '0007!, '0014!, '0015!</p>	1-17

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHTInternationales Aktenzeichen
PCT/EP2005/002325**Feld II Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)**

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. Ansprüche Nr. weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
Insofern die Ansprüche 14-17 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen (Artikel 52(4) EPÜ), wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.
2. Ansprüche Nr. weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. Ansprüche Nr. weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld III Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.:
4. Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
 Die Zahlung zusätzlicher Recherchengebühren erfolgte ohne Widerspruch.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2005/002325

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung		Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 03030965	A	17-04-2003	WO DE	03030965 A2 10294532 D2		17-04-2003 26-08-2004
WO 9627657	A	12-09-1996	US WO US US	2004214997 A1 9627657 A1 6045818 A 5906828 A		28-10-2004 12-09-1996 04-04-2000 25-05-1999
WO 2004006951	A	22-01-2004	AU CA EP WO US	2003256506 A1 2493081 A1 1551449 A1 2004006951 A1 2004115216 A1		02-02-2004 22-01-2004 13-07-2005 22-01-2004 17-06-2004